

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-157987

⑪ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)6月30日

C 12 N 15/00

A-8412-4B

1/20

G-6760-4B

// (C 12 N 1/20
C 12 R 1:19)

6760-4B 審査請求 未請求 発明の数 6 (全15頁)

⑭ 発明の名称 遺伝子発現系

⑮ 特 願 昭62-95024

⑯ 出 願 昭62(1987)4月17日

優先権主張 ⑰ 1986年4月17日 ⑱ デンマーク(DK) ⑲ 1777/86

⑳ 発 明 者 スベン ハストルブ デンマーク国, 2400 ケーベンハウソ エンペー, フレデリクスボルグバイ 10, 3. テーホー。
㉑ 出 願 人 ノボ インダストリ デンマーク国, 2880 バグスバエルト, ノボ アレ(番地)
アクティーゼルスカブ なし)
㉒ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外4名

明 細 書

1. 発明の名称

遺伝子発現系

2. 特許請求の範囲

1. 発現ベクターと「トランス作用DNAセグメント」とから成る遺伝子発現系であって、上記発現ベクターが、1個以上の発現される遺伝子と、バチルス(Bacillus)種からのゲノムのセグメントから成る上記「トランス作用DNAセグメント」によって産生されるトランス作用因子に应答する1個(以上)のシス作用調整要素とから成ることを特徴とする遺伝子発現系。

2. 「トランス作用DNAセグメント」を発現ベクターに配置する、特許請求の範囲第1項記載の遺伝子発現系。

3. 「トランス作用DNAセグメント」を発現ベクターとは異なるベクター上に配置する、特許請求の範囲第1項記載の遺伝子発現系。

4. 「トランス作用DNAセグメント」およびシス作用調整要素をバチルス・スプチリス

(Bacillus subtilis)、バチルス・プミルス

(Bacillus pumilus)またはバチルス・サーキュランス(Bacillus circulans)、好ましくはバチルス・スプチリス(Bacillus subtilis)から得る、特許請求の範囲第1項～第3項のいずれか1項記載の遺伝子発現系。

5. 発現ベクターを有するバチルス・スプチリスにおいて遺伝子を発現させるための遺伝子発現系であって、上記ベクターがバチルス・スプチリスのゲノムによって産生されるトランス作用因子に应答する1個以上のシス作用調整要素を有することを特徴とする遺伝子発現系。

6. トランス作用因子をキシロースで不活性化し、特許請求の範囲第1項～第5項の1項または記載の遺伝子発現系。

7. 「トランス作用DNAセグメント」が配列

1 開始 12 24 36
GTGGATATCGCT CATCAAACCTTT GTCAAAAAGTA
FM D T A D Q T P V K K V

48 60 72
AATCAAAAAGTTA TTATTAAGAA ATCCTTAAAAAT
N Q K L L L K E I L K N

(1)

(2)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

84 96 108 120 132 144 156 168 180 192 204 216 228 240 252 264 276 288 300 312 324 336 348 360 372 384 396 408 420 432
 TCACCTATTCA AGAGCAAAATTA TCTGAAATCACT
 S P I S R A K L S P M T
 120 132 144 156 168 180 192 204 216 228 240 252 264 276 288 300 312 324 336 348 360 372 384 396 408 420 432
 GGATTAATAAA TCAACTGTCTCA TCACAGGTAAC
 G L N K S T V S S Q V N
 156 168 180 192 204 216 228 240 252 264 276 288 300 312 324 336 348 360 372 384 396 408 420 432
 ACGTTAATGAAA GAAAGTATGGTA TTTGAAATAGGT
 T L M K B S H V F E I G
 192 204 216 228 240 252 264 276 288 300 312 324 336 348 360 372 384 396 408 420 432
 CAAGGACAATCA AGTGGCGGAAGA AGACCTGTCTATG
 Q G Q S S G G R R P V M
 228 240 252 264 276 288 300 312 324 336 348 360 372 384 396 408 420 432
 CTGTGTTTTAAT AAAAAGGCAGGA TACTCCGTTGGA
 L V P N K K A G Y S V G
 264 276 288 300 312 324 336 348 360 372 384 396 408 420 432
 ATAGATGTTGGT GTGGATTATATT AATGGCATTITA
 I D V G V D Y I N G I L
 300 312 324 336 348 360 372 384 396 408 420 432
 ACAGACCTTGA GGAACAATCGTT CTGATCAATAC
 T D L E G T I V L D Q Y
 336 348 360 372 384 396 408 420 432
 CGCCATTITGAA TCCAATCTCCA GAAATAACGAAA
 R H L E S N S P E I T K
 372 384 396 408 420 432
 GACATTTTGATT GATATGATTTC CACTTTTATTAG
 D I L I D M I H H F I T
 408 420 432
 CAAATGCCCAA TCTCCGTACGGG TTTATTGGTATA
 Q M P Q S P Y G F I G I

(3)

804 816 828
 AAGGCTTTTATTA AAATCTCTTCAG ACCAAAGAGAAA
 K A L L K S L Q T K E K
 840 852 864
 AAAGTGTCTTAT CAAGATATCATA AACCTCGCCCAT
 K L S Y Q D I I N L A H
 876 888 900
 CTGAATGATATC GGAACCTTAAAT GCATTACAAAAT
 L N D I G T L N A L Q N
 912 924 936
 TTTGGATTCTAT TTAGGAATAGGC GTTACCAATATT
 F G P Y L G I G L T N I
 948 960 972
 CTAAATACTTTC AACCCACAAGCC GTAATTTAAGA
 L N T F N P Q A V I L R
 984 996 1008
 AATAGCATAATT GAATCGCATCCT ATGGTTTAAAT
 N S I I E S H P M V L N
 1020 1032 1044
 TCAATGAGAAGT GAAGTATCATCA AGGGTTTATCC
 S M R S E V S S R V Y S
 1056 1068 1080
 CAATTAGGCAAT AGCTATGAATTA TTGCCATCTTCC
 Q L G N S Y E L L P S S
 1092 1104 1116
 TTAGGACAGAA GCACCGGCATTA GGAATGTCTTCC
 L G Q N A P A L G M S S
 1128 1140 1152 停止 I
 ATTGTGATTGAT CATTTTCTGGAC ATGATTACAATG TAA
 I V I D H P L D M I T H (xyIR)

(5)

を有し、且つシス作用調節要素が配列

-35' -10'
 AACCTTCTGAAAAAGATGTTGAAAAAGTCGAAAGGATTTTATAATATTAA
 (P.O.)
 GTCAGTTAGTTTGTGTTGATCAACAACTAAT

または配列

-35' -10'
 AAAAACTAAAAAATATTGAAAAACTGACGAGGTTATATAAGATGAA
 (P.O.)
 AATAAGTTAGTTTGTGTTTAAACAACAACTAAT

を有する、特許請求の範囲第6項記載の遺伝子発現系。

8. 発現される1個以上の遺伝子が非対応遺伝子である、特許請求の範囲第1～7項の1項または記載の遺伝子発現系。

9. 遺伝子生成物の産生を刺激する方法であって、

(a) バチルス種のゲノムから得られ、トランス作用因子を暗号化する「トランス作用DNAセグメント」を宿主に挿入して

(b) 発現される1個以上の遺伝子生成物を暗号化する1個以上の遺伝子および上記「トランス

(6)

作用 DNA セグメント」から産生される上記トランス作用因子に应答する 1 個以上のシス作用調節要素から成る発現ベクターを上記宿主中に挿入し、

(c) 宿主を培養し、所望ならば

(d) 適当な時間に、上記トランス作用因子を不活性化する化合物を培養物に添加して、上記所望な遺伝子生成物の産生を開始することから成る刺激法。

10. 「トランス作用 DNA セグメント」を発現ベクター上に配置して宿主中に発現ベクターと共に挿入する、特許請求の範囲第 9 項の方法。

11. 「トランス作用セグメント」およびシス作用要素が、バチルス・スプテリス、バチルス・ブミルスまたはバチルス・サーキュランス、好ましくはバチルス・スプテリスから得られる、特許請求の範囲第 9 項または第 10 項のいずれか一項に記載の方法。

12. バチルス・スプテリスに置ける遺伝子生成物の産生を刺激する方法であって、

(a) 発現される遺伝子生成物を暗号化する遺

伝子およびバチルス・スプテリスのゲノムによって生成されるトランス作用因子に应答するシス作用調節要素とから成る発現ベクターを宿主に挿入して、

(b) 宿主を培養して、所望ならば

(c) 適当な時間にトランス作用因子を不活性化する化合物を加えて、所望な遺伝子生成物の産生を開始することから成る刺激法。

13. トランス作用因子がキシロースによって不活性化される、特許請求の範囲第 9 ～ 12 項の 1 項またはに記載の方法。

14. トランス作用 DNA セグメントが、配列

```

1 開始      12      24      36
GTGGATATCGCT CATCAACCTTT GTCAAAAAGTA
FM D T A D Q T F V K K V

      48      60      72
AATCAAAAGTTA TTATTAAGAA ATCCTTAAAT
N Q K L L L K E I L K N

      84      96     108
TCACCTATTTC AAGCAAAATTA TCTGAAATGACT
S P I S R A K L S F M T

      120     132     144
GCATTAAATAA TCAACTGTCTCA TCACAGCTAAAC
G L N K S T V S S Q V N

```

(7)

(8)

```

      156     168     180
ACGTTAATGAAA GAAAGTATGCTA TTGAAATAGT
T L M K E S H V F E I G

      192     204     216
CAAGGACAATCA AGTGGCGGAAGA AGACCTGTCTG
Q G Q S S G G R R P V M

      228     240     252
CTTGTITTTAAT AAAAAGGCAGCA TACTCCGTTGGA
L V F N K K A G Y S V G

      264     276     288
ATAGATGTTGGT GTGGATTATAT AATGGCATTITA
I D V G V D Y I N G I L

      300     312     324
ACAGACCTTGAA GGAACAATCGTT CTTGATCAATAC
T D L E G T I V L D Q Y

      336     348     360
CGCCATTGGCAA TCCAATTCTCCA GAAATAACGAAA
R H L E S N S P E I T K

      372     384     396
GACATTTTGATT GATATGATTCAT CACTTTATTACG
D I L I D M I H H F I T

      408     420     432
CAAAATGCCCAA TCTCCGTACGGG TTTATTGGTATA
Q H P Q S P Y G F I G I

      444     456     468
GGTATTGGCTG CCTGGACTCATT GATAAAGATCAA
G I C V P G L I D K D Q

      480     492     504
AAAATTGTTTTC ACTCCGAATCC AACTGGAGAGAT
K I V F T P N S N W R D

```

(9)

```

      516     528     540
ATTGACTTAAAA TCTTCGATACAA GAGAAGTAGAAT
I D L K S S I Q E K Y N

      552     564     576
CTCTCTCTTTT ATTGAAATGAG GCAATGTGCGC
V S V P I E N E A N A G

      588     600     612
GCATATGGAGAA AAATATTGGA GCTGCAAAAAAT
A Y G E K L F G A A K N

      624     636     648
CACGATAACATT ATTTACGTAAGT ATCAGCACAGGA
H D N I I Y V S I S T G

      660     672     684
ATAGGGATCGGT GTTATTATCAAC AATCATTATAT
I G I G V I I N N H L Y

      696     708     720
AGAGGAGTAAGC GGCTTCTCTGGA GAAATGGGACAT
R G V S G F S G E H G H

      732     744     756
ATGACAATAGAC TTTAATGCTCCT AAATGCAGTTGC
M T I D F N G P K C S C

      768     780     792
GGAAACCGAGGA TGCTGGGAATTC TATGCTTCAGAG
G N R G C K E L Y A S E

      804     816     828
AAGGCTTTATTA AAATCTCTTCAG ACCAAAGAGAAA
K A L L K S L Q T K E K

      840     852     864
AAACTGCTCTAT CAAGATATCATA AACCTCGCCCAT
K L S Y Q D I I N L A H

```

(10)

876 888 900
CTGAATGATATC GGAACCTTAAAT GCATTACAAAAT
L N D I G T L N A L Q N
912 924 936
TTTGGATTCTAT TTAGGAATAGGC CTTACCAATATT
P G P Y L G I G L T N I
948 960 972
CTAAATACITTC AACCCACAAGCC GTAATTITAAGA
L N T P N P Q A V I L R
984 996 1008
AATAGCATAATT GAATCGCATCTT ATGGTTTAAAT
N S I I E S H P M V L N
1020 1032 1044
TCAATGAGAAGT GAAGTATCATCA AGGGTTTATTC
S M R S E V S S R V Y S
1056 1068 1080
CAATTAGGCAAT AGCTATGAATTA TTGCCATCTTC
Q L G N S Y E L L P S S
1092 1104 1116
TTAGGACAGAAT GCACCGGCATTA GGAATGTCTCC
L G Q N A P A L G M S S
1128 1140 1152 停止！
ATTGTGATTGAT CATTTTCTGGAC ATGATTACAATG TAA
I V I D H P L D M I T H (xylR)

を有し、且つシス作用調節要素が配列

-35' -10'
AACITTCGAAAAAGATGTTGAAAAAGTCGAAAGGATTTTATAATATTAA
GTCAAGTTAGTTTGTGTTGATCAACAACTAAT (P.O.)

(11)

19. トランス作用要素が キシロースにより不活性化さ
れていて、特許請求の範囲第16項のいずれか1項
に記載のベクター。

まれる、ベクター。

18. 「トランス作用セグメント」およびシス作
用要素が、バチルス・スプチリス、バチルス・ブ
ミルスまたはバチルス・サーキュランス、好まし
くはバチルス・スプチリスから得られる、特許請
求の範囲第16項または第17項のいずれか1項
に記載のベクター。

20. トランス作用DNAセグメントが、配列

開始 12 24 36
GTGGATATCGGT CATCAAACCTTT GTCAAAAAAGTA
f M D T A D Q T P V K K V
48 60 72
AATCAAAAAGTTA TTATTAAGAA ATCCITAAAAAT
N Q K L L L K E I L K N
84 96 108
TCACCTATTTCA AGAGCAAAATTA TCTGAAATGACT
S P I S R A K L S P M T
120 132 144
GGATTAATAAA TCAACTGTCTCA TCACAGGTAAC
G L N K S T V S S Q V N
156 168 180
ACGTTAATGAAA GAAAGTATGCTA TTTGAAATAGT
T L M K E S M V F E I G
192 204 216
CAAGGACAATCA AGTGGCGAAGA AGACCTGTCTG
Q G Q S S G G R R P V M

(13)

または配列

-35' -10'
AAAAAACTAAAAAAATATTGAAAAATCTGACGAGGTTATATAAGATGAA
AATAAGTTAGTTTGTITTAACAACTAAT (P.O.)

を有する、特許請求の範囲第13項記載の方法。

15. 発現される遺伝子が非対応性遺伝子である
特許請求の範囲第9～14項の1項または2項に記載の
方法。

16. 遺伝子生成物を発現するのに使用するベク
ターであり、1種以上の遺伝子生成物およびバチ
ルス種から得られるDNAセグメントによって暗
号化されるトランス作用転写因子にตอบสนองする1種
以上のシス作用調節要素とから成るベクター。

17. 遺伝子生成物を発現するのに使用するベク
ターであり、バチルス種から得られ、1種以上の
遺伝子生成物を暗号化するDNAに連結している
1種以上のシス作用調節要素を抑制するトランス
作用転写因子を暗号化するDNAセグメントから
成り、1種以上の遺伝子生成物を暗号化するDN
Aと1種以上のシス作用調節要素がベクターに含

(12)

228 240 252
CTTGTITTTTAAAT AAAAAGGCAGGA TACTCCGTTGGA
L V P N K K A G Y S V G
264 276 288
ATAGATGTTGGT GTGGATTATATT AATGGCATTITTA
I D V G V D Y I N G I L
300 312 324
ACAGACCTTGAA GGAACAATCGTT CITGATCAATAC
T D L E G T I V L D Q Y
336 348 360
CGCCATTGGA TCCAATTCTCCA GAAATAACGAAA
R H L E S N S P E I T K
372 384 396
GACATTTTGATT GATATGATTCAT CACTTTATTACG
D I L I D M I R H P I T
408 420 432
CAATGCCCCAA TCTCCGTACGGG TTTATTGGTATA
Q H P Q S P Y G P I G I
444 456 468
GGTATTGCGTG CCTGGACTCATT GATAAAGATCAA
G I C V P G L I D K D Q
480 492 504
AAAATTGTTTC ACTCCGAACCTCC AACTGGAGAGAT
K I V P T P N S N W R D
516 528 540
ATTGACTTAAAA TCTTCGATACAA GAGAAGTACAT
I D L K S S I Q E K Y N
552 564 576
CTCTCTCTTTT ATTGAAATGAG GCAATGCTGCC
V S V P I E N E A N A G

(14)

588 600 612
 GCATATGGAGAA AACTATTGGA GCTGCAAAAAAT
 A Y G E K L P G A A K N
 624 636 648
 CACGATAACATT ATTTACGTAAGT ATCAGCACAGGA
 R D N I I Y V S I S T G
 660 672 684
 ATAGGGATCGGT GTTATTATCAAC AATCATTATAT
 I G I G V I I N N R L Y
 696 708 720
 AGAGGAGTAAGC GGCITCTCTGGA GAAATGGGACAT
 R G V S G P S G E M G H
 732 744 756
 ATGACAATAGAC TTTAATGGTCCT AAATGCAGTTGC
 H T I D P N G P K C S C
 768 780 792
 GGAACCGAGGA TGCTGGGAATTG TATGCTTCAGAG
 G N R G C K E L Y A S B
 804 816 828
 AAGGCTTTATTA AAATCTCTTCAG ACCAAAGAGAAA
 K A L L K S L Q T K E K
 840 852 864
 AAATGTCCTAT CAAGATATCATA AACCTCGCCAT
 K L S Y Q D I I N L A H
 876 888 900
 CTGAATGATATC GGAACCTTAAT GCATTACAAAT
 L N D I G T L N A L Q N
 912 924 936
 TTTGGATTCTAT TTAGGAATAGGC CTTACCAATATT
 P G P Y L G I G L T N I

(15)

を有する、特許請求の範囲第19項記載のベクター。

21. 発現される遺伝子が非対応性遺伝子である、特許請求の範囲第16~20項の1項または記載のベクター。

22. 微生物を形質転換させる特許請求の範囲第16~21項の1項または記載のベクターの使用。

23. 特許請求の範囲第16~21項のいずれか1項記載のベクターで形質転換した微生物。

24. 遺伝子生成物を産生させるための特許請求の範囲第23項記載の微生物の使用。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、一般的には発現ベクターおよび「トランス作用DNAセグメント」から成る遺伝子発現系に関し、発現ベクターが1個以上の発現される遺伝子と上記「トランス作用DNAセグメント」によって産生されるトランス作用因子にตอบสนองする1個以上のシス作用因子とから成る遺伝子発現系に関する。更に詳細には、本発明は、上記「トラ

(17)

948 960 972
 CTAAATACCTTC AACCCACAAGCC GTATTTTAAGA
 L N T P N P Q A V I L R
 984 996 1008
 AATAGCATAATT GAATCGCATCCT ATGGTTTAAAT
 N S I I B S H P H V L N
 1020 1032 1044
 TCAATGAGAAGT GAATATCATCA AGGGTTTATTC
 S M R S B V S S R V Y S
 1056 1068 1080
 CAATTAGGCAAT ACCTATGAATTA TTGCCATCTCC
 Q L G N S Y E L L P S S
 1092 1104 1116
 TTAGGACAGAAT GCACCGGCATTA GGAATGTCCTCC
 L G Q N A P A L G M S S
 1128 1140 1152 停止
 ATTGTGATTGAT CATTTCTGGAC ATGATTACAATG TAA
 I V I D B F L D M I T N (xylR)

を有し、且つシス作用調節要素が配列

"-10"
 AACTTTCTGAAAAAGATCTTGAAAAAGTCGAAAGGATTTTATAATATTAA
 (P.O.)
 GTCAAGTTAGTTTGTGTTGATCAACAACTAAT

または配列

"-35"
 AAAAACTAAAAAATATTGAAAAATCTGACGAGGTTATATAAGATGAA
 (P.O.)
 AATAAGTTAGTTTGTGTTAATCAACAACTAAT

(16)

ンス作用DNAセグメント」および上記シス作用調節要素がバチルス種からのゲノムの1個以上のセグメントから成っている上記遺伝子発現系に関する。

(従来の技術)

この関与した遺伝子のオペレーターから成るDNA配列にリプレッサー分子を結合することによって、転写相において特定の遺伝子の発現を調節して、RNAポリメラーゼがプロモーターに結合するのを防止し、誘導物質がリプレッサー分子に結合することによって誘導が起こり、リプレッサーに構造シフトが起こり、リプレッサーのオペレーターに対する親和性を低下させる遺伝子発現系がエシェリキア・コリー(Escherichia coli)で公知である。

例えばラクトース・オペロンのようなかかるオペレーター-リプレッサー制御系は、多年に亘ってエシェリキア・コリー(E.coli)において外来遺伝子を発現させるのに使用されてきた。

(18)

近年になって、多くの理由からバチルス属、具体的にはバチルス・スプチリス(*Bacillus subtilis*)における外来遺伝子のクローニングおよび発現に興味が向けられるようになってきた。エシェリキア・コーリーとは対照的に、バチルス・スプチリス(*B. subtilis*)は病原体ではなく、しかも内毒素を生成しない。また、バチルス・スプチリスは培地にタンパクを多量に放出する分泌系を有する。その遺伝子地図は十分に特性化されており、またバチルス・スプチリスは工業的に広く用いられているので、この有機体の大規模培養についての多量の情報を利用することができる。バチルス・スプチリス株の一つの欠点である孢子形成は、孢子無形成バチルス・スプチリス株の開発によって防止されてきた。

しかしながら、転写水準で作用するバチルス属でこれまでに知られている遺伝子発現系は誘導によって調節されず、異なる機構を用いている。これらの有機体の遺伝子調節はRNAポリメラーゼに結合しRNA開始の認識部位を決定する δ 因子

(19)

れるかまたは外来遺伝子生成物がバチルス・スプチリスに由来する外酵素からのタンパク分解作用によって分解することを示した。それ故、これらの試みにおける外来タンパクの収量は、大幅に変動するものであった。

エシェリキア・コーリーにおいては、この問題点は上述のような誘導オペレーター-リプレッサー発現系を用いることによって軽減された。

バチルス・スプチリスにおいてエシェリキア・コーリーからのラクトースリプレッサー-オペレーターを用いることはYansura と Henner によって報告されている(Proc. Natl. Acad. Sci. USA、81(1984)439 ~ 443 頁)。しかしながら、この解決法はラクトースオペレーター-リプレッサー系がバチルス属に由来するものでないという欠陥を有する。

多年に亘り、バチルス属に置ける多数の酵素の産生/生成が成長媒質におけるキシロースおよびその他の糖によって誘導することができることが知られているが、この現象の機構は解明されない

(21)

によって制御される。かかる系は外来遺伝子の制御された発現には容易に用いることができない。

バチルス・スプチリスにおいて外来遺伝子を発現させる試みは、今日まで α -アミラーゼが誘導される分泌ベクターを使用することに集中してきた [palva ら、Gene、22(1983)、229 ~ 235 頁; Ulmanen ら、J. Bacteriol.、162(1985)、176 ~ 182 頁; および Meyer と Flechter、Environ. Microbiol.、50(1985)、503 ~ 507 頁]。

(発明が解決しようとする問題点)

遺伝子をクローニングした有機体の一般的問題点は、外来または異常タンパクの発現が低いことである。遺伝子の発現は、細胞生理を決定する環境条件によって変わる。多くの場合に、生成物形成の最適培養条件は最適成長条件とは同一ではなく、ある場合には、外来遺伝子生成物は宿主有機体に対して有毒となることもある。

上記バチルスにおいて外来遺伝子を発現させる試みから得られた結果は、転写水準で転写が行わ

(20)

ままであった。キシロースによって誘導される酵素は、I. G. Roncero(J. Bacteriol. 156(1983)、257 ~ 263 頁)によって記載されているようなキシラン利用を必要とする酵素である。

多年に亘り、このキシロース誘導は、好適な発育相が培養によって得られたとき、すなわち対数発育相が停止して培養が一定の成熟に達したときにのみ起こることも知られている。

キシラナーゼを産生する構造遺伝子は、クローニングして、エシェリキア・コーリーおよびバチルス・スプチリスにおけるキシラナーゼの発現に用いられてきた(特公昭第75286-A号および第198978-A号)。

(問題点を解決するための手段、発明の作用および効果)

驚くべきことには、バチルス・スプチリスにおいてキシラン消化酵素の産生を誘導する機構はオペレーター-リプレッサー型のものであることを見出した。

(22)

更に、包含された遺伝子を単離して、パチルス・スプチリスのゲノムにおける上記オペレーター・リプレッサー発現系の構造および塩基配列を決定することが可能であった。

このことは、更に他の糖の添加によって誘導される他の酵素の産生もかかるオペレーター・リプレッサー系によって制御されることを示唆している。

従って、本発明は、発現ベクターおよびトランス作用DNAセグメントから成る新規遺伝子発現系であって、発現ベクターが1個以上の発現される遺伝子および1個以上のシス作用調節要素であって上記「トランス作用DNAセグメント」によって産生されるトランス作用因子にตอบสนองする要素から成り、上記「トランス作用DNAセグメント」およびシス作用調節要素はパチルス種のゲノムから得られることを特徴とする新規遺伝子発現系を提供する。

第二の観点において、本発明は遺伝子生成物の産生を刺激する方法であって、

(23)

子にตอบสนองする1種以上のシス作用調節要素から成るベクターを提供する。

第四の観点では、本発明は、遺伝子生成物を発現するのに使用するベクターであって、パチルス種から得られ且つ1種以上の遺伝子生成物を暗号化するDNAにカップリングしている1種以上のシス作用調節要素を抑制するトランス作用転写因子を暗号化するDNAセグメントから成るベクターであって、1種以上の遺伝子生成物および暗号化するDNAおよび1種以上のシス作用調節要素が包含されるものを提供する。

第五の観点では、本発明は、上記第三または第四の観点によるベクターで形質転換された新規微生物を提供する。

第六の観点では、本発明は、本発明の新規遺伝子発現系を用いて形質転換された微生物の産生法およびかかる形質転換された微生物を用いて基の微生物に対して非対応性の遺伝子生成物の産生法を提供する。

本発明を図面について以下に更に詳細に説明す

(25)

(a) パチルス種のゲノムから得られ、トランス作用因子を暗号化する「トランス作用DNAセグメント」を宿主に挿入して

(b) 発現される1個以上の遺伝子生成物を暗号化する1個以上の遺伝子および上記「トランス作用DNAセグメント」から産生される上記トランス作用因子にตอบสนองする1個以上のシス作用調節要素から成る発現ベクターを上記宿主中に挿入し、

(c) 宿主を培養し、所望ならば

(d) 宿主の数が所望な水準に達した適当な時間、上記トランス作用因子を不活性化化する化合物を培養物に添加して、上記シス作用調節要素を抑制解除することによって、1種以上の上記所望な遺伝子生成物の産生を開始することから成る刺激法を提供する。

第三の観点では本発明は、遺伝子生成物を発現するのに用いるベクターであって、1種以上の遺伝子生成物を暗号化するDNAおよびパチルス種から得られ且つベクターに包含されるDNAセグメントによって暗号化されるトランス作用転写因

(24)

る。

上述のように、本発明は、第一の観点では、発現ベクターおよびトランス作用DNAセグメントから成る新規遺伝子発現系であって、発現ベクターが1個以上の発現される遺伝子および1個以上のシス作用調節要素であって上記「トランス作用DNAセグメント」によって産生されるトランス作用因子にตอบสนองする要素から成り、上記「トランス作用DNAセグメント」およびシス作用調節要素はパチルス種のゲノムから得られることを特徴とする新規遺伝子発現系に関する。

一つの系はパチルス・スプチリスから生じ、その本来の状態では2種のシス作用調節要素（プロモーター・オペレーター）であってそれぞれ2個の遺伝子の転写を調節するものと2個のプロモーター・オペレーターがตอบสนองするトランス作用因子（リプレッサー・遺伝子）を暗号化する一つのDNAセグメントとから成る。

この系はパチルス・スプチリスのキシロースおよびキシロース・ポリマーでの成長に必要な酵素

(26)

の産生を調節し、リプレッサー分子は媒質中におけるキシロースの存在によって抑制解除される。

しかしながら、発育相の調節のために、対数増殖期が完了して適当な数に達した後のみ誘導が起こるので、成長媒質から誘導物質分子(キシロース)を除く必要はない。

これによって、系がバチルスを形質転換するのに用いられるときには自動調節することができ、キシロースは初期の発育媒質に含まれる。

系の解明において、驚くべきことには、リプレッサー遺伝子が2種の調節されるオペロンの間に配置され、転写は2個のオペロンの転写の反対方向であることを見出した。

本発明の目的に系を用いるには、少なくとも一つのプロモーターに関して一つの遺伝子を除けば、上記要素を総て用いる必要はない。

本発明の系の一つの態様はこのように遺伝子発現系を意図するものであり、発現ベクターは上記トランス作用因子に応答する一つのシス作用調節要素から成っている。

(27)

向に転写されても、転写の方向がどちらであってもしリプレッサーが作用することが見出された。

この系は、エシェリキア・コーリーのような他の属の微生物においても作用し、その場合にのみ関連する微生物に由来するプロモーターをバチルスオペレーターの前に挿入しなければならないことも見出された。

上記のように、キシロースで誘導されるバチルス・スプチリスからの本発明の遺伝子発現系の構造および塩基配列が決定され、従ってリプレッサーを暗号化する遺伝子xyIRは以下の塩基配列

```

開始      12      24      36
GTGGATATCGCT CATCAAACTTT GTCAAAAAAGTA
FM D T A D Q T P V K K V

      48      60      72
AATCAAAAGTTA TTATTAAAGAA ATCCTTAAAAAT
N Q K L L L K E I L K N

      84      96     108
TCACCTATTTC AAGCAAAATTA TCTGAAATGACT
S P I S R A K L S F M T

     120     132     144
GGATTAAATAAA TCAACTGTCTCA TCACAGGTAAC
G L N K S T V S S Q V N
  
```

(29)

バチルスでは、リプレッサー遺伝子が既に存在しており、従ってバチルスを形質転換するのに用いられるベクターにリプレッサー遺伝子を挿入する必要はない。

もう一つの態様では、本発明は上記トランス作用因子に応答する2種の異なるシス作用調節要素から成る発現ベクターを用いることによって少なくとも2種の異なる非対応遺伝子生成物を同時に産生することができる。

バチルス・スプチリス以外の微生物においてこの系を使用するには、「トランス作用DNAセグメント」を発現ベクターに配置することが必要ではないが期待される。

バチルスを形質転換することによって得られる結果はリプレッサー遺伝子を含む発現ベクターを用いるときに優れているので、この有機体は実際にはリプレッサーを暗号化する数個の遺伝子を有することも見出された。

多数の実験において、本来の系におけるリプレッサー遺伝子は2個のオペロンの転写と反対の方

(28)

```

      156      168      180
ACGTTAATGAAA GAAAGTATGGTA TTGAAATAGGT
T L M K E S H V F E I G

      192      204      216
CAAGGACAATCA AGTGGCGGAAGA AGACCTGTCTAG
Q G Q S S G C R R P V M

      228      240      252
CTTGTITTTTAA TAAAAAGGAGGA TACTCCGTTGGA
L V P N K K A G Y S V G

      264      276      288
ATAGATGTTGGT GTGGATTATATT AATGGCATTITA
I D V G V D Y I N G I L

      300      312      324
ACAGACCTTGAA GGAACAATCGTT CTGATCAATAC
T D L E G T I V L D Q Y

      336      348      360
CGCCATTTGCAA TCGAATTCCTCCA-GAAATAACGAAA
R H L E S N S P E I T K

      372      384      396
GACATTTTGATT GATATGATTCAT CACITTTATTACG
D I L I D M I H H P I T

      408      420      432
CAAATGCCCCAA TCTCGGTACGGG TTTATTGGTATA
Q H P Q S P Y G P I G I

      444      456      468
GGTATTTGCGTG CCTGGACTCATT GATAAAGATCAA
G I C V P G L I D K D Q

      480      492      504
AAAATTGTTTTC ACTCCGAAGTCC AACTGGAGAGAT
K I V F T P N S N W R D
  
```

(30)

```

516      528      540
ATTGACTTAAAA TCTTCGATACAA GAGAAGTACAAT
I D L K S S I Q B K Y N

552      564      576
CTCTCTCTTTT ATTGAAATGAG GCAATGCTGGC
V S V P I E N E A N A G

588      600      612
GCATATGGAGAA AACTATTGGA GCTGCAAAAAAT
A Y G E K L F G A A K N

624      636      648
CAGGATAACATT ATTTACGTAAGT ATCAGCACAGGA
B D N I I Y V S I S T G

660      672      684
ATAGGATCGGT GTTATTATCAAC AATCAITTTAT
I G I G V I I N N H L Y

696      708      720
AGAGGAGTAGC GCTTCTCTGGA GAAATGGGACAT
B G V S G F S G E M G H

732      744      756
ATGACAATAGAC TTTAATGGTCTT AAATGCAGTTGC
H T I D P N G P K C S C

768      780      792
GGAACCGAGGA TGCTGGGAATG TATGCTTCAGAG
G N R G C K E L Y A S E

804      816      828
AAGGCTTTATTA AAATCTCTTCAG ACCAAGAGAGAA
K A L L K S L Q T K E K

840      852      864
AACTGTCTCTAT CAAGATATGATA AACCTCGCCAT
K L S V Q D I I N L A H

```

(31)

および

```

      -35°      -10°
AAAAAATAAAAAAATATTGAAAATACGAGGTTATATAAGATGAA
ATAAGTTAGTTTGTAAACAACAATAAT
(P10)

```

(矢印はオペレーターO、およびO₂の結合部位を示す)。

キシロース上での生育に必要な遺伝子のパチルス・スプチリスにおける転写に重要なレギュロン構造は、次のようにして決定した。

クローニング

パチルス・スプチリス株DN497からのDNAを制限酵素BglIIで部分的に消化して2~10 kbのフラグメントを1%アガロースゲルから単離した。次に、DNAをBamHIで切断した脱ホスホリル化したプラスミドpBR322(New England Biolabs社製)で連結した後、エシェリキア・コリーMC1000rnに形質変換した。選択はアンピシリンプレート上で行い、形質転換体を2 mMの4-メチルウンベレフェリル-D-キシロシドと共に噴霧した。

(33)

```

876      888      900
CTGAATGATATC GGAACCTTAAAT GCATTACAAAT
L N D I G T L N A L Q N

912      924      936
TTGGATTCTAT TTAGGAATAGGC CITACCAATATT
F G F Y L G I G L T N I

948      960      972
CTAAATACTTTC AACCCACAAGCC GTAATTTTAAGA
L N T P N P Q A V I L R

984      996      1008
AATAGCATAATT GAATCGCATCCT ATGTTTTTAAAT
N S I I E S H P M V L N

1020      1032      1044
TCAATGAGAAGT GAATATCATCA AGGCTTTATTCC
S M R S E V S S R V Y S

1056      1068      1080
CAATTAGGCAAT AGCTATGAATTA TTGCCATCTTCC
Q L G N S Y E L L P S S

1092      1104      1116
TTAGGACAGAAT GCACCGGCATTA GGAATGCTCTCC
L G Q N A P A L G M S S

1128      1140      1152 停止
ATTGTGATTGAT CATTTTCTGGAC ATGATTACAATG TAA
I V I D H P L D N I T M (xy1R)

```

を有し、且つ2個のプロモーター-オペレーター配列P₁₀およびP₂₀は以下のようになる。

```

      -35°      -10°
AATTTTCTGAAAAAGATGTTGAAAAAGTCGAAAGGATTTTAAATATTA
GTCAGTTAGTTTGTITGATCAACAACTAAT
(P10)

```

(32)

酵素1.4-D-キシロシダーゼを暗号化するxynB遺伝子を担持するコロニーを、蒸剤の加水分解により紫外線に暴露したときに蛍光体として検出した。

遺伝子xynBは8.4 kbフラグメント上に見出され、更に精確に印され且つ配列された。その遺伝子は、第一の遺伝子(xynC)が長く伸びた疎水性アミノ酸を有するタンパクを暗号化する2個のシストロン性オペロンにおける最後の遺伝子であることが示された。

エシェリキア・コリーでは、xynBの転写は部分的にはxynCから生じ、部分的にはプラスミドプロモーターから生じることが示された。pDN1050にクローニングしてパチルス・スプチリスDN497に形質転換した時、強い転写がxynCの上流の320 bp MspI-BglIIフラグメントから起こる。

xynCの下流のDNAは、キシロースが不在であるときにのみこの転写を抑制することを見出した。これは、最初のクローニングに抑制遺伝子(xy1R)が存在したことを示唆した。SDS-ペー

(34)

ジゲル電気泳動法はクローン化したDNAはxynBと同様に調節されるが、それ自体のプロモーターから転写されるもう一つの遺伝子を含んでいることを示した。これは、酵素キシロースイソメラーゼ(xylA)を暗号化する遺伝子であることを示された。

xylR遺伝子はxynBおよびxylAの間にあり、DNA上のもう一つのストランドから読まれる(第1図)。この遺伝子は1152 bpの長さであり、リプレッサーモノマーは384個のアミノ酸から成ることを意味する。

リプレッサーによって調節された2個のプロモーターは、GilsenとChamberlainとによって記載された酵素S1によって印された(Cell、35、285～93頁)。

キシロースレグロンの構造は、レギュロンの制限地図をも含んでいる第1図に示され、転写の方向は矢印で示している。

以下空白

(35)

スプチリス168の誘導体であった(Splizzen、Proc. Natl. Acad. Sci. 44、1072～78頁、1958)。RUB200: aro1906、amyE07およびamyR2は、Dr. Frank Young、ロチェスター大学、ニューヨークから得た。SL438: trpC2(孢子形成およびプロテアーゼ欠損)はDr. Kim Hardy、Biogen、ジュネーブから得た。DN497: amyE07およびamyR2はSL438からのクロモゾームDNAによるRUB200のaro+形質転換体であり、QB1133: aro1906、metB5、sacA321、amyEはDr. Georges Rapport、IRBM、パリから得た。QB1130: dal、metB5、sacA331およびamyEはBacillus Genetic Stock Center、コロンバス、オハイオから得た。DN608: dal-1、metB、sacAおよびamyEはQB1130からのクロモゾームDNAによるQB1133のaro+およびdal-1形質転換体であった。

Sh28c: metB、sacA、aryEおよびxynBは、DN497からのクロモゾームDNAによるDN608へのコングレーションによって作り、xynBにおいて4bpを欠失している(崩壊したPstI部位)。

(37)

(実施例)

以下の実施例では、プロモーター-オペレーター-P₁₀およびP₂₀およびリプレッサー遺伝子xylRを各種微生物を形質転換するのに用いた多数のベクターを構成するのに用いて、本発明の遺伝子発現系の作用性を説明した。これらの実施例は、本発明を制限することを意図するものではない。

また、上記説明および以下の実施例においては、以下にまとめた多数の微生物を用いた。

方法

プラスミドおよびクロモゾームDNAの調製およびパチルス・スプチリスおよびエシェリキア・コーリーの形質転換は、以下の一般的処理法に従って行った。制限酵素を用いる消化、Bal 31スクレーパー処理、オリゴDNA-リンカーの挿入およびDNAのT4-リガーゼとの連結は、New England Biolabs社製の酵素を用いて、同社によって指示された条件で行った。

菌株

総てのパチルス・スプチリス株は、パチルス・

(36)

Sh165: DN497のプロテアーゼ弱ニトロソグアニジン変異株。

エシェリキア・コーリー(E. coli): MC1000: P-lacX74 galP、galK、(leu-ara)7697(Casablan, M.J.およびCohen, S.N.(1980)、J. Mol. Biol. 7697、138、179～207頁)。この菌株は通常の方法でr-m+とした。

プラスミド

エシェリキア・コーリー

pBR322: Sutcliffe, J.G.(1979) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.、43、77～90頁)。

パチルス・スプチリス

pDM 1050: デンマーク特許出願第5940/84号明細書。

1. パチルス・スプチリスの転写

Yasbinらの方法にしたがって競合パチルス・スプチリス細胞を調製した(J. Bacteriol. 121:296～304頁、1975)。細胞を、次に遠心分離(7000 rpm、3分間)によって回収して、20%グリコールを含む上澄の10分の1容量に再分散して、

(38)

液体窒素中で凍結し、 -70°C で保存した。形質転換を行うため、凍結した細胞を 42°C で融解し、1容量の緩衝液(0.4%グルコース、0.04Mの MgCl_2 、および0.002MのEDTAを有するSpizizenの最少培地(Spizizen, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 44:1072~78, 1958))と混合した。DNAを加えて、混合物を 37°C で20分間振盪しながらインキュベーションした。次に、細胞を適当な選択的媒質上に採取した。

II. エシエリキア・コーリーの形質転換

エシエリキア・コーリーK-12株802号をLB(水1リットル当たり10gのバクト・トリプトン、5gのバクト酵母抽出液および10gの NaCl 、 $\text{pH}7.0$)中で一晚培養したものを、500mL LBで100倍に希釈し、 37°C で450m μ での吸光度が0.4になるまで生育させた。培養物を冷却させ、15分間氷上に放置し、15分間3000rpm(Sorvall GS3 ローター)で遠心分離し、200mLの冷たい0.1Mの CaCl_2 に再分散し、氷上で20分間放置し、10分間3000rpmで遠心分離

し、5mLの冷たい0.1Mの CaCl_2 に再分散し、氷上に20時間放置した。次に、冷たいグリコールを10%になるまで加え、一部を液体窒素中で凍結させ、 -70°C で保存した。凍結した細胞を氷上で融解させ、DNAを加え、混合物を氷上で45分間、 37°C で2分間インキュベーションして、次いで適当な選択的媒質上に採取した。

III. エシエリキア・コーリーからプラスミドの調製

エシエリキア・コーリーを250mL LB、0.4%グルコースおよび適当な抗生物質中で一晚生育させた。細胞を遠心分離によって回収して、4mLの緩衝液1(0.025Mトリス・ HCl 、 $\text{pH}8.0$ 、0.01MのEDTA、0.05Mのグルコース、2mg/mLのリゾチム)に最分散した。分散液を 0°C で15分間インキュベーションした後、8mLの緩衝液2(0.2Mの NaOH 、1%SDS)と混合した。次いで、6mLの緩衝液3(3M酢酸ナトリウム、 $\text{pH}4.8$)を加え、混合物を 0°C で60分間保持した後、19000rpm(Sorvall SS34 ロータ

(39)

(40)

ーで約45000g)で20分間遠心分離した。上澄液を0.6容の冷イソプロパノールを用いて沈澱して、1.2mLの5TE(0.05Mのトリス・ HCl 、 $\text{pH}8.0$ 、0.005MのEDTA)と20 μL の沸騰RNアーゼA(Boehringer)(2mg/mL)とに再分散した。30分後に、溶液をVT165チューブ中の4.0mL緩衝液4(80g CsCl および56mLの5TE)と0.1mLのEtBr(10mg/mL臭化エチジウム)の最上部に積層した。混合物を45000rpmで20時間遠心分離した。プラスミドを、次にチューブから除いて、透析して、第VI項で記載のように抽出した。

IV. バチルス・スブチリスからのプラスミドの調製

製

プラスミドは、以下の修正を行ったことを除いて、エシエリキア・コーリー株で説明した通りに調製した。生育は、0.01Mのリン酸カリウム、 $\text{pH}7.0$ および適当な抗生物質(例えば、6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ クロラムフェニコール)および所望ならば100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のD-アラニンを含むLG中で行

った。回収した後、細胞をリゾチムと共に 37°C でインキュベーションした。緩衝液2を1容の緩衝液2および3容の緩衝液5(0.2Mのグリシン、0.2Mの NaCl および1%SDS)との混合物によって置換した。以下の工程は、IIIと同じであった。

V. バチルス・スブチリスからプラスミドの小規模調製

(0.01Mのリン酸塩、 $\text{pH}7.0$ および適当な抗生物質および所望ならばD-アラニンを含む)LB中の5mLバチルス・スブチリスからのプラスミドを、1. 緩衝液の容量を4分の1に減少させ、2. 緩衝液3の後に0.5mLフェノールおよび0.5mLのクロロホルムを加え、3. 19000rpmで遠心分離した後、上澄液をエタノールで沈澱させ、400 μL の緩衝液6(0.05Mのトリス・ HCl 、 $\text{pH}8.0$ 、0.1M酢酸ナトリウム)に再分散させ、プラスミドを再度沈澱させ、400 μL の緩衝液6に再分散させ、沈澱させて、洗浄して、100 μL のTE(0.01Mトリス・ HCl 、 $\text{pH}8.0$ 、0.001

(41)

(42)

MのEDTA)中に $1\mu\text{g}/\text{mL}$ の沸騰RNアーゼA (Boehringer)と共に再分散した。

VI. バチルス・スブチリスからクロモゾームDNA

Aの調製

約 50mL の培地から凍結した細胞のペレットを 1.1mL の緩衝液(0.05M のトリス・HCl、 $\text{pH}=7.4$ 、 0.1M のNaCl、 2.5% スクロース)中に再分散した。 $100\mu\text{L}$ のリゾチーム($25\text{mg}/\text{mL}$)および $150\mu\text{L}$ のEDTA(0.5M 、 $\text{pH}=8.0$)を加えた。混合物を 37°C で 30 分間インキュベーションした。 2mL の 0.2% SDSを加えた後、 30 分間 37°C でインキュベーションした。 1g のCaCl₂と 0.05mL EtBr($10\text{mg}/\text{mL}$)を 0.95mL の混合物に対して加え、混合物を 15°C で 20 時間VT165ローター(Beckman)中で 45000rpm で遠心分離した。

DNAを長波長紫外線ランプの下に配置して、シリンジでチューブに孔を開けて採取した。EtBrをイソプロパノールで抽出し、溶液をTEE(0.01M のトリス・HCl、 $\text{pH}=8.0$ 、 0.01M の

BDTA)に対して 2 時間透析した。次に、溶液をTEEで 8mL に調整してフェノールで 2 回抽出し、クロロホルムで 1 回抽出した。DNAを 0.1M のNaClと冷エタノールで沈澱させ、 1mL TE(0.01M のトリス・HCl、 $\text{pH}=8.0$ 、 0.001M のEDTA)に溶解した。クロモゾームDNAを 4°C に保持した。

(実施例)

実施例1および2

pSX 50

本発明による 2 個の基本的遺伝子発現系を構成して、xylRからの調節によって P_{01} および P_{02} によってクロン化させ、発現させることができた。

pSX 56

第2図には、以下の実施例に用いられる基本ベクターの一つであるpSX 50の制限地図が示してある。図に示されるように、この制限地図は、(C1a1に変換された)BglIIフラグメントに対する 322MspI 上のプロモーター-オペレーター

(43)

P_{01} 、SalIフラグメントに対する 2.5kb C1a1上のバチルス・アミルスxylR遺伝子およびxylRが開始前 134bp から祖の低死後 82bp までSphIフラグメントに対して 1380bp BamHI上でのバチルス・スブチリスxylR遺伝子から成る。総て、プラスミドpDN1050(2.5kb)に挿入した。

pSX 56

第3図は、もう一つの基本ベクターpSX 56の対応する制限地図を示す。図に示されるように、バチルス・スブチリスxylR遺伝子およびxylRが開始する前 215bp からその停止後 82bp までC1a1に対して 1475bp のEcoRI上でのプロモーター-オペレーター P_{02} およびpSX 50における同様のxynB遺伝子から成る。また、総て、プラスミドpDN1050(2.65kb)に挿入した。

これらの 2 個のプラスミドのいずれかを用いて形質転換したバチルス・スブチリスSHa 28(xynB-)はキシロースなしで生育させたものと比較して 0.2% キシロース上で生育させたとき、p-ニトロフェニル- β -D-キシロピラノシド(Sigma)

(45)

の加水分解によって測定されるキシロシダーゼ活性の因子が $150\sim 200$ にまで増加することを示す。この試験の結果を第4A図に示し、ハッチした部分はキシロース(+)を用いて生育させた細胞からの細胞内流体のキシロシダーゼの含量を示し、となりの空白の部分はキシロースなしで(-)生育させた細胞からの細胞内流体にキシロシダーゼが不在であることを示している。

実施例3

pSX 50上のxynBのC1a1-BamHフラグメントを、細胞外アルカリ性プロテアーゼ・スブチリシン・カールスバーグ(extracellular alkaline protease subtilisin Carlsberg)を暗号化するバチルス・リケニホルミス(Bacillus licheniformis)からのapr遺伝子で置換して、プラスミドpSX 55を得た(第5図)。

第4B図は、キシロースを用いておよび用いずに生育させたこのプラスミドで形質転換したSHa 28の上澄液を示す。キシロースがない場合には、スブチリシンバンドは見られず、 0.28% キシ

(46)

ロースの存在で細胞を生育させたときには、スプチリンが主要なバンドである。

実施例 4 および 5

pSX 52 および pSX 59

仔牛のプロキモシン遺伝子をキシロシダーゼからの最初の 12 個のアミノ酸から成りプロキモシンに続いて融合タンパクを暗号化する遺伝子を生成するパチルス・ブミルス_{xyb}遺伝子に融合させた。

この融合体を pSX 50 および pSX 56 上で ClaI - Hind III 中にクローン化して、プラスミド pSX 52 および pSX 59 (第 6 および 7 図) を得た。

これらのプラスミドを用いて、パチルス・スプチリス_{SHA 16530}(DN197(プロテアーゼ(-) (ニトログアニジン))) を形質転換させた。

第 4 C 図の細胞内流体のウェスタンブロットである最初の 4 個の帯はプロキモシン遺伝子がキシロースによって制御されていることを示している。

以下余白

(47)

第 2 図は、本発明にのベクター pSX 50 の構造を有し、

第 3 図は、本発明によるもう一つのプラスミド pSX 56 の構造を示し、

第 4 A, B および C 図は、10% SDS-PAGE 本発明のベクターで形質転換した微生物からの細胞内流体および上澄液のウェスタン・ブロットからの結果を示し、

第 5, 6, 7 および 8 図は、それぞれ更に別の 4 個の本発明のベクターの構造を示す。

特許出願人

ノボ インダストリ アクティーゼルスカプ

特許出願代理人

弁理士 青 木 朗

弁理士 西 館 和 之

弁理士 石 田 敬

弁理士 山 口 昭 之

弁理士 西 山 雅 也

(49)

実施例 6

pSC 62

エシェリキア・コリー_{rrnB}ターミネーターをプロキモシン遺伝子の後の pSX 52 中でクローン化してプラスミド pSX 62 (第 8 図) を得て、SHA 165 を形質転換するのに用いた。第 4 C 図の帯 5 および 6 はこのプラスミドがプロキモシンの量を著しく増加させることを示す。総タンパクの約 40%。

実施例 7

pSX 71

pSX 62 における_{xyb}遺伝子における第一および第三の EcoRV 部位の間の 820bp の欠失を行い、プラスミド pSX 71 であって_{xyb}遺伝子が破壊されたプラスミドを得た。このプラスミドを用いて SHA 165 を形質転換した。第 4 C 図の帯 7 および 8 は明らかに、プロキモシンの産生が最早キシロースによって制御されないことを示している。

4. 図面の簡単な説明

第 1 図は、本発明の遺伝子発現系から成るキシロースレギュロンの制限地図を示し、

(48)

FIG. 1

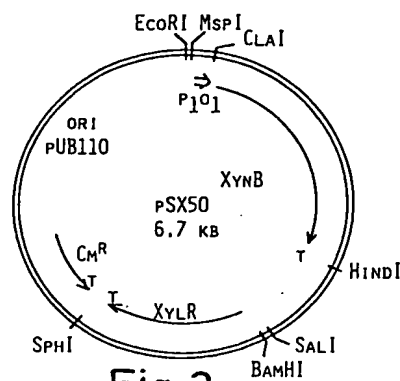
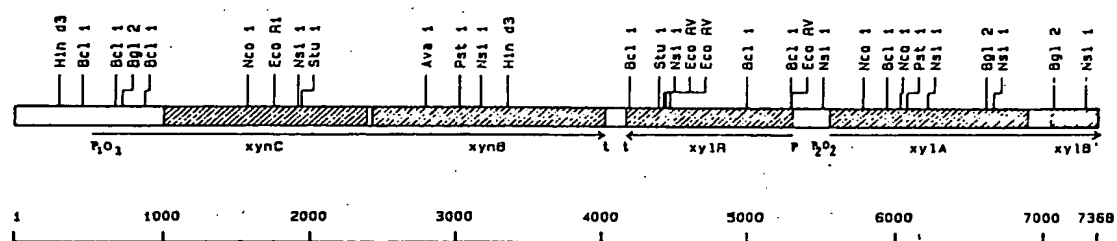


Fig. 2

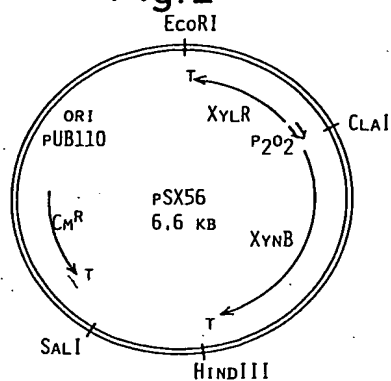


Fig. 3

図面の浄書(内容に変更なし)

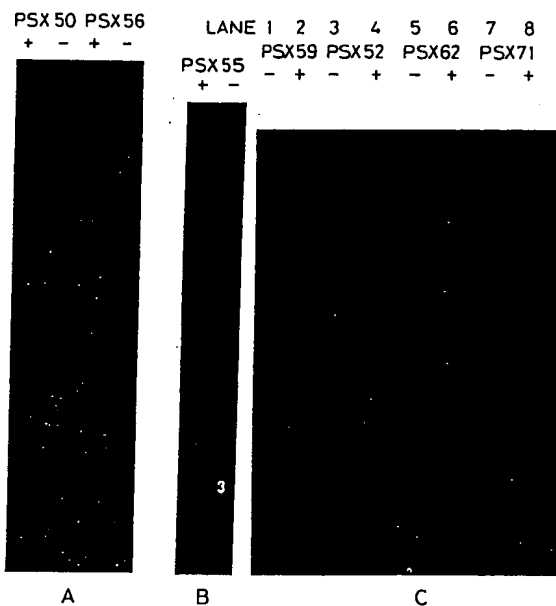


FIG. 4

-: キシロースなしでの生育を示す
+: キシロースを用いての生育を示す

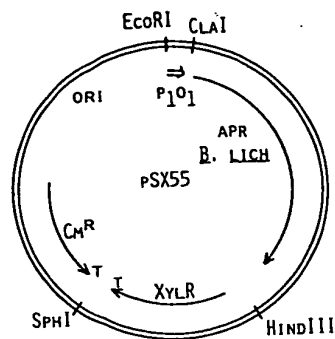


Fig. 5

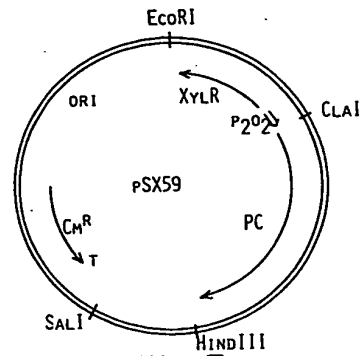


Fig. 7

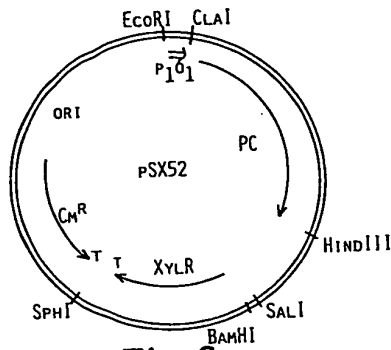


Fig. 6

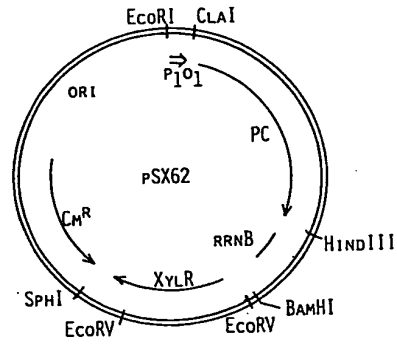


Fig. 8

手続補正書(方式)

昭和62年11月30日

特許庁長官 小川 邦夫 殿

1. 事件の表示

昭和62年特許願第095024号

2. 発明の名称

遺伝子発現系

3. 補正をする者

事件との関係

特許出願人

名称 ノボ インダストリ
アクティゼルスラブ



4. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号

静光虎ノ門ビル 電話 504-0721

氏名 弁理士(6579) 青木 朗

(外4名)



5. 補正命令の日付

昭和62年6月30日 (発送日)

6. 補正の対象

- (1) 明細書の「図面の簡単な説明」の欄
- (2) 図面(第4図)

7. 補正の内容

- (1) 明細書第49頁第8行、「示し」を『を示した図面に代わる写真であり、』と補正する。
- (2) 図面の浄書(第4図)(内容に変更なし)

8. 添付書類の目録

浄書図面(第4図)

/ 通

上申書

/ 通